

THESIS

Münster

1968

ÜBER EIN ENCYM-ERHÖHENDES VIRUS
AUS MÄUSEGESCHWÜLSTEN
(RILEY-VIRUS)

VI. Der Virusgehalt bei Tumormäusen
und das Wachstum von Transplantationstumoren
nach Virusinfektion

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

Helmut *O*stertag

Aus dem Institut für Pathologie der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. B ü n g e l e r

ÜBER EIN ENZYM-ERHÖHENDES VIRUS AUS MÄUSEGESCHWÜLSTEN

(RILEY-VIRUS)

VI. DER VIRUSGEHALT BEI TUMORMÄUSEN UND DAS WACHSTUM
VON TRANSPLANTATIONSTUMOREN NACH VIRUSINFEKTION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Ostertag

aus Heubach

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof.Dr.A.GEORGII
Korreferent:	Prof.Dr.W.BÜNGELER
Dekan:	Prof.Dr.F.MARGUTH

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.1968

MEINEN ELTERN
GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. E I N L E I T U N G

RILEY u. Mitarb. entdeckten 1960 ein Virus in Tumoren von Laboratoriumsmäusen, das eigenartige Enzymveränderungen verursacht (28): Wenn normalen Mäusen zellfreie Filtrate von Mäusetumoren injiziert wurden, so trat in der Folge bei diesen Tieren eine bis zu 10-fache Konzentrationssteigerung der Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum auf, die lebenslang anhielt. Auch andere Dehydrogenasen wurden in ähnlicher Weise durch die Filtratinjektion aus Transplantationstumoren verändert. Dieser Effekt entstand auch bei weiteren Serumpassagen auf unbehandelten Mäusen, die zwar beliebig reproduzierbar. Der Anstieg von Serum-LDH bei Tumormäusen, der ja in Verbindung mit dem Tumorstadium auch bei menschlichen Patienten allgemein bekannt ist (HILL u. Mitarb., 10; SCHWARTZ u. Mitarb., 32), schien deshalb nicht vom Tumor abhängig zu sein, sondern konnte unabhängig bei Mäusen durch Injektion von zellfreien Tumorfiltraten, von Serum, oder von Organfiltraten der Tumortiere ausgelöst werden. Diese Befunde legten die Virusnatur des auslösenden Agens nahe.

Von vielen Autoren konnten die Ergebnisse von RILEY u. Mitarb. bestätigt werden, wobei das Virus immer nur bei tumortragenden Mäusen gefunden wurde (ADAMS u. Mitarb., 1; GEORGII, 4, 5; GEORGII u. Mitarb., 6, 8; MUNDY u. Mitarb., 14; NOTKINS u. Mitarb., 15-17; ROWSON u. Mitarb., 29).

Dieser virusartige Faktor wird heute als LDH-Virus oder besser als RILEY-Virus (RV) bezeichnet, weil durch ihn nicht nur der Spiegel der LDH, sondern wie erwähnt auch der anderer Dehydrogenasen erhöht wird.

Bei systematischen Untersuchungen zeigte es sich, daß Riley-Virus in Spontantumoren nur in Ausnahmefällen enthalten sein kann (BAYERLE u. Mitarb., 13; GEORGII, 5; GEORGII u. Mitarb., 6; RILEY u. Mitarb., 26, 28; ZOBL, 34).

Darüber konnten KIRSCHENHOFER (11), sowie POPPE u. Mitarb. (19) zeigen, daß bei freilebenden grauen Mäusen RV gefunden werden kann, während Zuchtmäuse, Ratten und Hamster praktisch frei von dem Virus sind, wie KIRSCHENHOFER (11) kürzlich in unserem Labor nachgewiesen hat (s. auch GEORGII u. KIRSCHENHOFER, 7).

Nachdem weiter die RV-Infektion offenbar kein Tumorstadium und keinerlei morphologisch faßbare Gewebsveränderungen verursacht, wie zahlreiche Autoren zeigten, lag die Annahme nahe, daß es sich um eine Begleitvirusinfektion handelte. Wir selbst haben die These vertreten, es handle sich um eine zufällige Infektion der Mäusetumoren mit Riley-Virus von wildlebenden Mäusen aus, bei denen das RV sporadisch vorkommt, wobei die Infektion durch die fortlaufenden Transplantationspassagen eine so weite Verbreitung erfährt (GEORGII u. Mitarb., 7; KIRSCHENHOFER, 11).

Immerhin gibt es Befunde, die eine Beeinflussung des Tumorstadiums durch RV nahelegen. So konnten BAILEY u. Mitarb. (2) offenbar eine Beschleunigung des Wachstums von Impftumoren auf RV-infizierten Mäusen zeigen.

Wir selbst haben in einer früheren Untersuchung die Beziehungen zwischen den RV und dem Wachstum von soliden, sowohl autochthonen, wie transplantierten Tumoren untersucht (GEORGII u. Mitarb., 9). Dabei fanden wir, daß das Wachstum solider Tumoren nicht meßbar beeinflußt wird, und das Tumorgewebe keine höhere Konzentration von Virus als die übrigen Gewebe oder das Blutserum enthält. Diese Untersuchungen sind vor allem deshalb von Bedeutung, weil

RILEY (24) sowie schließlich wir selbst (GEORGII u. Mitarb., 9) festgestellt haben, daß bei tumortragenden Mäusen die Infektion mit Riley-Virus eine besonders starke Erhöhung an dem Serumenzym LDH bewirkt, die um ein mehrfaches höher liegt als bei normalen, nicht tumortragenden Mäusen. Es lag deshalb nahe, die Frage einer Beeinflussung von Tumorwachstum durch das RV weiterhin zu untersuchen, wobei wir ein nach unserer Meinung besseres Versuchssystem gewählt haben. Wir haben dazu Impftumoren in der Ascitesform verwendet, weil hier eine exakte Zellzahlbestimmung des Transplantates, eine genaue Verfolgung der Zellvermehrung des Ascitestumors möglich ist, das Wachstum des Tumors besser erfaßbar ist und schließlich Nekrosen oder andere regressive Veränderungen des Tumors weitgehend fehlen.

Die vorgelegten Untersuchungen bemühen sich um die Klärung von zwei Fragen:

Einmal ob die Konzentration von RV im Tumorgewebe höher ist als in anderen Geweben des gleichen Tieres, und zum anderen ob das RV das Wachstum dieser Impftumoren in irgendeiner Weise beeinflußt.

B. MATERIAL UND METHODE

Tiergut und Tierhaltung

Wir verwendeten ausgewachsene, weiße Mäuse eines nicht ingezüchteten Stammes NMRI aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover und aus der Versuchstierzucht Wiga in München.

Die Tiere wurden bis zu ihrer Verwendung in einem besonderen Stallraum zu je 30 Stück in Plastik Käfigen, getrennt nach Geschlechtern, gehalten. Vor dem Versuch wurde bei den Tieren durch Bestimmung der Serum LDH eine präexistente Infektion mit dem RV ausgeschlossen.

Während des Versuches wurden virusinfizierte und virusfreie Tiere in zwei getrennten Räumen gehalten.

Bei Virustitrationsversuchen zur Bestimmung der ID₅₀/ml (REED u. MUENCH, 21) hielten wir die unterschiedlich infizierten Tiere getrennt in verschiedenen Käfigen.

Die Tiere wurden mit Preßfutter (Murilan) ernährt, Wasser erhielten sie durch Saugflaschen. Die Käfige und Wasserflaschen wurden regelmäßig vor Versuchsbeginn autoklaviert.

Bei dieser Haltung ist nach unserer Erfahrung eine horizontale Stallinfektion mit dem RV zu verhindern.

Tumoren

1. Landschütz-Ascites Sarkom (SaI Tumor)

Der Tumor ist 1952 als ein retroperitoneales Rethotel-sarkom der Maus spontan entstanden und konnte auf Mäuse transplantiert werden (LÖBLICH u. Mitarb., 12).

Der Tumor wird seit 11 Jahren als Ascitestumor an unserem Institut auf weißen Mäusen (früher Inzucht AB und jetzt NMRI) gehalten. Der Tumor ist mit dem LDH-Virus durchseucht (GEORGII u. Mitarb., 6).

2. Krebs-Ascites Tumor (KAT)

Der Tumor ist heterotransplantabel und kann deshalb von der Maus auf die Ratte und wieder zurück auf die Maus transplantiert werden. Das ist insofern wichtig, als das RV nach wenigen Tagen Tumorwachstums auf der Ratte verloren geht (RAUEN u. Mitarb., 20; RILEY u. Mitarb., 27) und der Tumor vom RV gereinigt werden kann.

Den SaI Tumor und den KAT hielten wir am Institut durch Transplantation von 0,5 ml Tumor per Maus in wöchentlichen Abständen. Bei der Transplantation von KAT bestimmten wir bei Spender- und Empfängertieren zuvor die Serum-LDH, um eine zufällige Infektion mit dem LDH-Virus auszuschließen. Hämorrhagische Tumoren wurden nicht verwendet.

Virus

RV isolierten wir in der Regel aus dem SaI Tumor. Zur Herstellung virushaltiger Lösungen verdünnten wir den Tumor mit weißer Hanks'scher Lösung 1:1. Dieses Gemisch wurde in einem Bühlerhomogenator bei 0°C eine Minute lang homogenisiert. Das Homogenat blieb bei +4°C 20 Minuten lang stehen, um Virus aus den Zelltrümmern zu eluieren. Nachdem wir das Homogenat in der Christzentrifuge bei 3-5000 g für 35 Minuten zentrifugiert hatten, schickten wir den Überstand mit Stickstoffüberdruck von 2,5 atü durch einen mit 4 ml weißer Hanks'scher Lösung angefeuchteten Seitzfilter EKS II (Porengröße 0,8-1,4 µ). Die Sterilität des Filtrats prüften wir durch Auspfeifen auf

Merck-Bouillonkulturen. Die so gewonnene Viruslösung wurde in sterile Glasampullen abgefüllt und diese sofort zugeschmolzen. Nach schneller Abkühlung durch Trockeneis bewahrten wir das Material bis zur Verwendung im Versuch bei -50°C auf.

Verwendeten wir zur Virusgewinnung statt eines SaI Tumors Organe (Leber, Milz und Nieren) von Mäusen, so war der Herstellungsprozeß derselbe, nur daß das Ausgangsmaterial wegen seiner Konsistenz nicht 1:1, sondern 1:10 mit Hanks'scher Lösung verdünnt wurde. Die virushaltigen Lösungen injizierten wir den Versuchstieren intraperitoneal (ip.).

Virusnachweis

Das LDH-Virus wird allgemein durch die von ihm verursachte Erhöhung der Serum-LDH bei Mäusen nachgewiesen (GEORGII, 4). Der Anstieg der Serum-LDH beginnt zwei Tage nach der gesetzten Infektion und hält lebenslang an. Wir bestimmten vier Tage nach der Infektion die Serum-LDH. Als positiver Virusnachweis galten Werte über 50 Büchereinheiten (BÜE), wenn sie über mehrere Wochen anhielten. Die durchschnittliche Höhe der Serum-LDH von Mäusen, die frei von LDH-Virus sind, beträgt 31 BÜE (THORN, 33).

Der quantitative Virusnachweis erfolgte durch Verdünnungsreihen des Filtrates mit dem Faktor $1/10$. Jede Verdünnung wurde zwei Mäusen injiziert; vier Tage später bestimmten wir bei den Tieren die Serum-LDH und errechneten die ID_{50}/ml . Diese aufwendige Titrierung ist erforderlich, weil die Höhe der Serum-LDH nichts über den Virusgehalt aussagt (NOTKINS u. Mitarb., 18).

Bestimmung der Serum-LDH

Die Blutserumgewinnung geschah durch Punktion des retrooculären Venenplexus an Äther-narkotisierten Mäusen (RILEY, 22). Dazu verwendeten wir Glaspipetten von ca. 0,4 ml Fassungsvermögen. Die Pipetten mit dem geronnenen Blut wurden 20 Minuten bei 2500 U/min zentrifugiert. Durch den DPN-H Test bei 37°C im UV Spektrometer (Eppendorf) bestimmten wir die Höhe der LDH in Büchereinheiten (BUE) bezogen auf 1 ml Serum.

Versuchsbeschreibung

1. Versuch:

Bestimmung der Viruskonzentration in Tumoren und Organen von Mäusen sechs Tage nach der Tumortransplantation.

a) Versuch mit einem SaI Tumor:

Wir verdünnten einen SaI Tumor mit weißer Hanks'scher Lösung 1:1. Einen Teil dieses Gemisches verarbeiteten wir zu Filtrat. Die für den Versuch vorbereiteten Tiere (mindestens 8 Stück) teilten wir in zwei Gruppen. Auf die erste Gruppe transplantierten wir 1 ml des verdünnten Tumors pro Tier ip., der zweiten Gruppe injizierten wir dieselbe Menge von dem Filtrat ip.. Beide Gruppen erhielten also die gleiche Menge Virus auf dieselbe Weise appliziert.

Sechs Tage später töteten wir sowohl die Gruppe der tumortragenden als auch die der tumorfreien Mäuse, nachdem wir zuvor die Serum-LDH kontrolliert hatten. Mit Hilfe der ID₅₀/ml bestimmten wir den Virusgehalt des Tumors und der Organe bei der ersten Gruppe und den der Organe in der zweiten. Die Ausgangsverdünnung bei der Filtratherstellung war in diesem Fall bei Tumor und Organen dieselbe. In manchen Versuchsreihen untersuchten wir noch zusätzlich das Serum

auf dieselbe Weise. Wir führten 8 Versuchsreihen durch, davon zwei Reihen mit Tumortieren allein.

b) Versuch mit einem KAT:

Wir transplantierten auf sechs virusfreie Mäuse einen virusfreien KAT und beimpften die Tiere anschließend mit RV. Sechs Tage später töteten wir die Tiere und untersuchten den Virusgehalt des Tumors, der Organe und des Serums der Tiere. Hierzu führten wir drei Versuchsreihen durch.

2. Versuch:

LDH-Virus und Tumorwachstum.

Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und der Anwesenheit von LDH-Virus auf zwei verschiedene Arten:

- a) Wir transplantierten einen KAT auf 18 Mäuse; jedes Tier erhielt 0,5 ml Tumor ip.. Zehn Tiere wurden anschließend mit RV beimpft. Wir kontrollierten bei beiden Tiergruppen, den virusinfizierten und den virusfreien, täglich das Tumorstadium; als Maß dafür nahmen wir den größten Flankendurchmesser, den wir mit der Schublehre bei den am Schwanz hochgehobenen Tieren gemessen haben. Außerdem verglichen wir die Tumorstadiumsrate und die Absterberate beider Tiergruppen miteinander. Bei Versuchsende haben wir die Tumormenge bei den noch lebenden Tieren durch Aspiration der Tumorstoffigkeit in einer Rekordspritze gemessen. Den Zellgehalt der Tumoren bestimmten wir durch Auszählen in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop. Wir führten drei Versuchsreihen durch.
- b) Zum Versuch teilten wir 28 Mäuse (in der 2. Versuchsreihe waren es 25) in zwei Gruppen. Die erste beimpften wir mit RV. Nach zehn Tagen kontrollierten wir

bei beiden Gruppen die Höhe der Serum-LDH: bei den virusinfizierten Tieren war sie weit über 50 BUE, bei den Kontrolltieren lag sie unterhalb davon. Dann wurden beide Gruppen mit RV-freien KAT beimpft. Die Frist von zehn Tagen zwischen Virusinfektion und Tumortransplantation haben wir gewählt, weil sich die Virämie post infectionem erst nach dieser Zeitspanne auf einen konstanten Wert einstellt (ROWSON u. Mitarb., 30).

Jedes Tier bekam bei der Transplantation 5 Millionen vitale Tumorzellen. Zur Bestimmung der Rate von vitalen Tumorzellen wurde Ascites mit 0,5 % Eosin-Hanks'scher Lösung 1:10 verdünnt und nach einminütigem Schütteln unter dem Mikroskop in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Nekrotische Tumorzellen färbten sich zartrosa an, während lebende farblos blieben. Mit dieser von SCHREK (31) angegebenen Methode kann der Gehalt des Tumors an lebenden Zellen gut bestimmt und mit entsprechender Verdünnung genau eingestellt werden.

In fortlaufender Untersuchung am 3. (in der 2. Versuchsreihe am 2. Tag), 4., 6., 8. und 10. Tag nach der Tumortransplantation wurden folgende Werte bestimmt, wozu aus beiden Gruppen die beiden Tiere geopfert wurden, deren Serum-LDH und Körpergewicht dem Gruppendurchschnitt am nächsten lagen:

- 1) Volumen der Tumorzellen,
- 2) Index vitaler bzw. nekrotischer Tumorzellen,
- 3) mittlerer Zelldurchmesser,
- 4) Generationszeit der Zellen durch graphische Darstellung.

Der Hämatokritwert des Tumors wurde ermittelt, um das Volumen von Tumorzellen prozentual zum Volumen des

gesamten Ascitestumors zu bekommen. Dazu wurde das Peritoneum freigelegt und mit einer 2 ml Rekord-spritze 0,3 ml Tumor aspiriert.

Vor Aspiration des restlichen Tumors injizierten wir in die Bauchhöhle 100 IE Heparin (0,5 ml Li-quemin 1:25 verdünnt), um eine Agglutination der Tumorzellen zu verhindern. Der so präparierte Tumor wurde im Meßzylinder aufgenommen und die Bauchhöhle anschließend so lange mit Hanks'scher Lösung gespült, bis sie klar zurückkam. Die so verbrauchte Spülflüssigkeit füllten wir in denselben Meßzylinder wie den Tumor.

Das Volumen des Tumors war die Differenz zwischen verbrauchter Spülflüssigkeit und dem Gemisch aus Tumor und Spülflüssigkeit im Meßzylinder, unter Berücksichtigung der zuvor abgezweigten 0,3 ml Tumor und der hinzugefügten 0,5 ml Heparinlösung.

Durch Auszählen in der Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ermittelten wir den Gesamtzellgehalt des Tumors. Mit der Färbemethode von SCHREK (31) (siehe oben) wurde der Index lebender Tumorzellen festgelegt. Dann wurde der mittlere Zelldurchmesser mit dem Okularmikrometer an zehn zufällig in der Zählkammer ausgewählten Zellen bestimmt.

Die Generationszeit und damit die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren wurde aus der Zunahme des Zellgehaltes der Tumoren in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (LUCKE u. Mitarb., 13). Diese Bestimmung beruht auf folgender Methode: Der Zellgehalt des Tumors wird als Logarithmus zur Basis 2 in Abhängigkeit von der Zeit in ein Koordinatensystem eingetragen und die so erhaltenen Punkte geradlinig zu einer

Kurve verbunden. Um die Generationszeit für einen bestimmten Zeitpunkt nach der Tumortransplantation zu erhalten, errichtet man in dem entsprechenden Punkt auf der Abszisse die Lotrechte bis zum Schnittpunkt mit der Kurve. Durch diesen Schnittpunkt legt man eine Waagrechte und zu dieser eine Parallele im Abstand von +1 Logarithmus. In dem Punkt wo diese die Kurve oder deren geradlinige Verlängerung schneidet, fällt man die Lotrechte auf die Abszisse. Der Abstand der beiden Abszissenpunkte ergibt die gesuchte Generationszeit.

Wegen des großen Arbeitsaufwandes haben wir nur zwei Versuchsreihen mit diesen Messungen durchgeführt; damit war eine statistische Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen. Immerhin können wir einen Hinweis für die Richtigkeit unserer Messungen durch folgende Überlegung erbringen: Aus dem Volumen der Tumorzellen aufgrund des Hämatokritwertes und aus seiner Zellzahl kann man unter der Annahme einer Kugelgestalt der Tumorzellen den Durchmesser einer Tumorzelle errechnen. Die mit dem Okularmikrometer gemessenen Zelldurchmesser stimmten mit den errechneten gut überein.

C. E R G E B N I S S E

1. Der Infektionstiter in Tumoren und Organen von Tumormäusen

Die Ergebnisse des ersten Versuches mit dem Landschütz-Ascites Sarkom SaI sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

Tumormäuse mit Riley-Virus						Normalmäuse mit Riley-Virus		
Vers. Nr.	Ser. LDH	Tumorzel. pro cmm	Tumor-titer	Organ-titer	Serum-titer	Ser. LDH	Organ-titer	Serum-titer
1	339	258 000	$10^{7,5}$	10^6	$10^{8,5}$	96	$10^{7,5}$	10^4
2	224	154 500	10^{10}	$10^{2,5}$	$10^{6,2}$	64	10^6	10^7
3	148	221 000	10^{10}	10^5		91	10^3	
4	151	225 000	10^9	$10^{4,7}$		125	$10^{4,5}$	
5	105	88 250	$10^{4,2}$	$10^{2,7}$		98	$10^{3,5}$	
6	136	71 250	$10^{4,5}$	$10^{3,4}$		118	10^4	
7	168	262 000	$10^{3,5}$	10^6	10^3			
8	147		10^7	$10^{3,5}$	10^5			

Infektionstiter an RV bei Mäusen mit Landschütz Ascites Sarkom SaI sechs Tage nach der Tumortransplantation. Keine verwertbaren Unterschiede zwischen tumortragenden und normalen Mäusen. Für jede Versuchsreihe wurden 8 Tiere verwendet.

Die Werte der einzelnen Versuchsreihen differierten stark untereinander; so liegt z.B. der höchste und der niedrigste Virusgehalt bei den Tumoren um 6,5 Zehnerpotenzen auseinander. Es ergibt sich auch keine Beziehung zwischen Virusgehalt und dem Zellreichtum eines Tumors oder der Höhe der Serum-LDH.

Wir werteten die Ergebnisse statistisch mit Hilfe der Nullhypothese aus und fanden keinen wesentlichen Unterschied zwischen dem Virusgehalt des Tumors und dem der Organe bei den Tumortieren, und auch der Virusgehalt der Organe der Kontrolltiere unterscheidet sich nicht wesentlich von dem der Tumoren oder Organe bei den Versuchstieren.

Den Virusgehalt des Serums statistisch mit den anderen Ergebnissen zu vergleichen, war wegen der geringen Anzahl der Werte nicht möglich, aber die Tabelle zeigt ohnehin, daß der Virusgehalt des Serums sich kaum von den anderen Ergebnissen unterscheidet.

Im zweiten Experiment haben wir Mäuse mit Krebs-Ascites-Tumor (KAT) eingesetzt. Die Ergebnisse aus den drei Versuchsreihen sind in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2:

Vers. Nr.	Ser. LDH	Tumorzellen pro cmm	Tumor-titer	Organ titer	Serum-titer
1	68	189 500	10^6	$10^{4,25}$	10^5
2	73	108 000	$10^{5,25}$	$10^{4,25}$	10^4
3	104	181 750	$10^{5,5}$	10^5	10^6

Virusgehalt bei einem Versuch mit KAT sechs Tage nach der Tumortransplantation. Für jede Versuchsreihe wurden 6 Tiere verwendet.

Es ergibt sich, daß in allen drei Versuchsreihen fast übereinstimmende Werte für den Virusgehalt der untersuchten Chargen gefunden wurden. Das bedeutet, daß auch in diesem Tumor das RV gegenüber den Organen oder dem Blutserum nicht angereichert ist.

2. Riley-Virus und Tumorstadium

Die Frage, ob das LDH-Virus das Wachstum eines KAT beeinflußt, versuchten wir mit zwei verschiedenen Versuchen zu beantworten.

In einem ersten Versuch wurde täglich der Flankendurchmesser der Tumortiere gemessen und die Absterberate der Tiere während des Versuches bestimmt. Bei den am Ende des Versuches noch lebenden Tieren wurde die Tumormenge in ml und der Zellgehalt der Tumoren ermittelt.

Aus Tabelle 3 und Abbildung 1 ist ersichtlich, daß der Flankendurchmesser von Tumormäusen mit LDH-Virus-haltigem Tumor sich nicht von dem virusfreier Tumormäuse unterscheidet. Sowohl der Wachstumsverlauf als auch die erreichte Endgröße eines KAT sind unabhängig davon, ob der Tumor LDH-Virus enthält oder nicht.

Wir führten drei Versuchsreihen durch. Für jede Reihe verwendeten wir 18 Mäuse, 10 wurden mit Riley-Virus beimpft.

Tabelle 3:

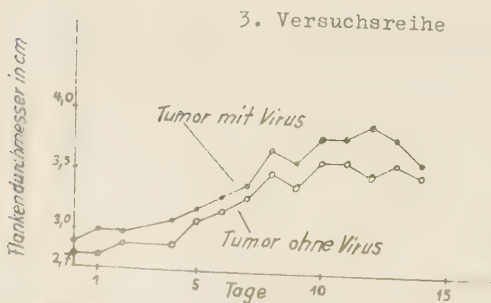
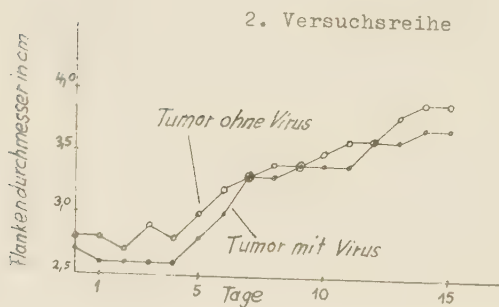
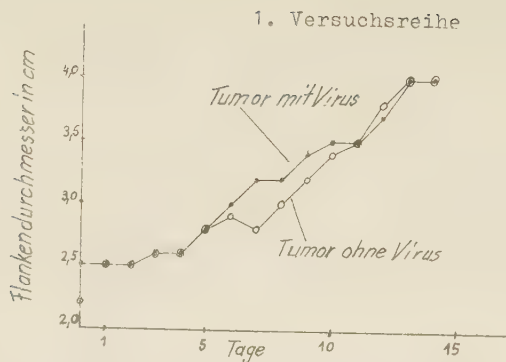
Vers. Nr.	Tage nach der Tumortransplantation															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Versuch																
1	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6	2,8	3,0	3,2	3,2	3,4	3,5	3,5	3,7	4,0	4,0	
2	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,8	3,0	3,3	3,3	3,4	3,4	3,4	3,6	3,6	3,7	3,7
3	2,9	3,0	3,0		3,1	3,2	3,3	3,4	3,7	3,6	3,8	3,8	3,9	3,8	3,6	

Kontrolle																
1	2,2	2,5	2,5	2,6	2,6	2,8	2,9	2,8	3,0	3,2	3,4	3,5	3,8	4,0	4,0	
2	2,8	2,8	2,7	2,9	2,8	3,0	3,2	3,3	3,4	3,4	3,5	3,6	3,6	3,8	3,9	3,9
3	2,8	2,8	2,9		2,9	3,1	3,2	3,3	3,5	3,4	3,6	3,6	3,5	3,6	3,5	

Wachstum eines Krebs-Ascites-Tumors (KAT) nach RV-Infektion und eines virusfreien KAT (Kontrolle), gemessen durch den Flanken-durchmesser der Tiere in cm.

Für jede Versuchsreihe wurden 18 Mäuse verwendet.

Abbildung 1:



Graphische Darstellung der Befunde aus Tabelle 3:
 Größenzunahme des Ascites nach RV-Infektion im Vergleich
 mit einer virusfreien KA. in 3 Versuchsreihen. Maß für die
 Tumorgroße ist der Flankendurchmesser der Tumormäuse.

In Übereinstimmung mit dem gleichartigen Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt die Tabelle 4, daß am Ende des Versuches das Volumen und der Zellgehalt von virushaltigen Tumoren gleich den der virusfreien sind. Das LDH-Virus beeinflußt auch nicht die Tumorangebrate bei der Tumortransplantation und ebenso wenig die Malignität der Tumoren, gemessen an der Absterberate der Tumortiere während des Versuches (Tabelle 5).

Tabelle 4:

Vers. Nr.		Tierzahl	Tumormenge in ml	Tumorzellen in Mill.
Versuch	1	3	13	434
	2	5	9,3	584
Kontrolle	1	6	14,8	652
	2	3	10,7	433

Durchschnittliche Ascitesmenge und Zellgehalt des Ascites bei den am Versuchsende noch lebenden Tieren.

In der 3. Versuchsreihe verendeten alle Tiere spontan.

Tabelle 5:

Vers. Nr.	Tumorange- rate	Absterberate in Prozent während des Versuches												
		6. Tag	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.			
Versuch														
1	100 %	0	0	0	0	0	10	30	30	30	30			
2	100 %	0	0	0	0	0	10	10	20	30	50			
3	90 %	0	0	0	11	11	11	11	66	77	100			

Kontrolle														
1	100 %	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12			
2	100 %	0	12	12	12	12	12	37	62	62	62			
3	100 %	0	0	0	0	12	12	12	50	75	100			

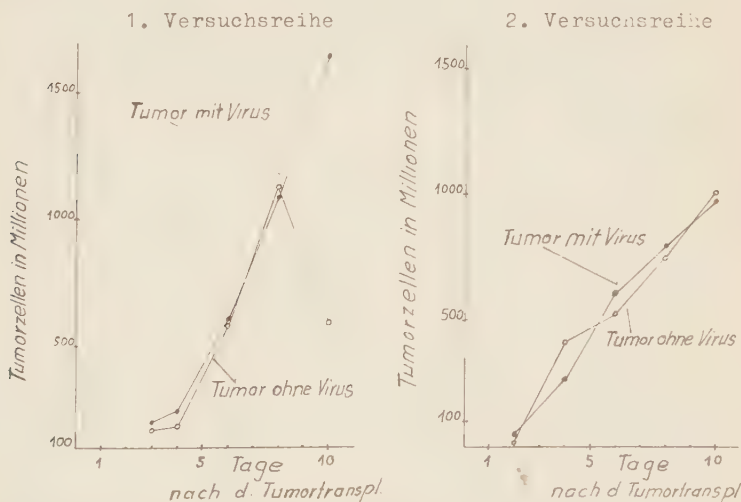
Tumorangeate und Absterberate bei Mäusen mit KAT, der LDH-Virus enthält (Versuch) oder virusfrei ist (Kontrolle).
Für jede Versuchsreihe wurden 18 Tiere verwendet, 10 davon wurden mit Riley-Virus beimpft.

In einem zweiten Versuch wurden folgende zusätzliche Werte bestimmt: die Größe des Tumorumfanges, die Zahl der im Tumor enthaltenen Tumorzellen, einmal der Anteil der lebenden Tumorzellen im Zellgehalt des Tumors, zum anderen der Durchmesser der Tumorzellen und die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6 und 7 am Ende dieses Abschnittes enthalten. Einen Teil haben wir in den Abbildungen 2, 3 und 4 graphisch dargestellt.

Keine der durchgeführten Untersuchungen ergibt Hinweise auf Wachstumsunterschiede zwischen den virusinfizierten und virusfreien Tumoren.

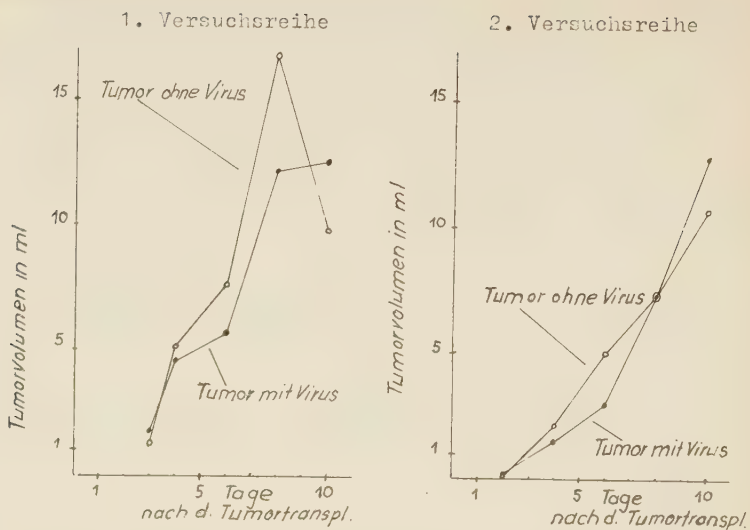
Die Ergebnisse sind in den beiden getrennt voneinander durchgeführten Versuchsreihen übereinstimmend.

Abbildung 2:



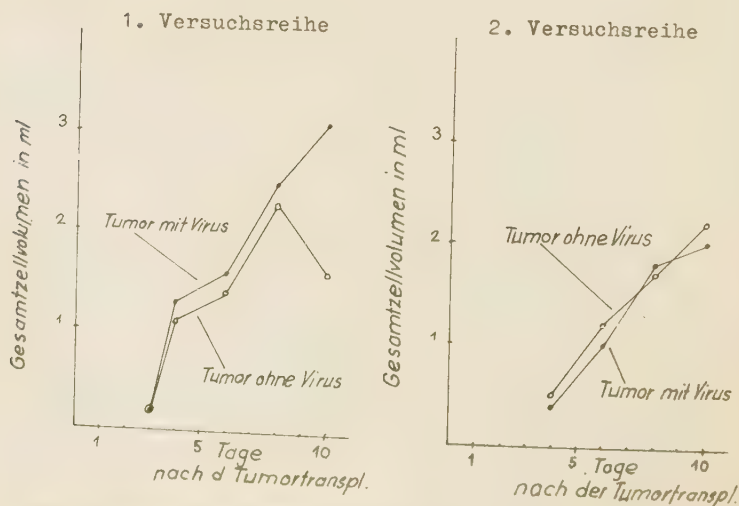
Zellgehalt eines mit KAT-Virus beimpften und eines virusfreien KAT. Transplantiert wurden 5 Millionen lebende Tumorzellen.

Abbildung 3:



Das Volumen eines mit Virus beimpften KAT im Vergleich mit dem eines virusfreien.

Abbildung 4:



Das Gesamtzellvolumen eines KAT, der Virus enthält, im Vergleich mit dem eines virusfreien.

Tabelle 6:

Tage nach der Tumortransplantation	3	4	6	8	10
Gesamtzellgehalt in Millionen	202 166	242 181	601 586	1 086 1 122	1 646 590 ^{*)}
Vitale Tumorzellen in Prozent	97,2 89,4	97,1 98,0	96,0 96,4	96,1 95,4	98,4 98,5
Tumorumfang in ml	1,8 0,2	1,3 0,2	5,1 1,1	12,2 2,5	12,6 3,1
Gesamtzellvolumen in ml					9,8 1,6
Durchmesser der Tumorzellen (in μ) gemessen berechnet	17,8 14,7	17,0 23,1	17,2 18,4	18,9 17,5	16,6 16,5
Generationszeit in h	108 88	33,6 67	55,2 105	99,6 102	18,7 17
Serum-LDH in BUE				23	110

Das Wachstum eines LDH-Virus enthaltenden KAT. In der 2. Spalte jeder Rubrik sind die Werte der virusfreien Kontrolltumoren aufgeführt. Erste Versuchsreihe.

*) Diese Spalte repräsentiert nur die Werte eines Tieres.

Tabelle 7:

Parameter der Tumortransplantation	2	4	6	8	10
Gesamtzellgehalt in Millionen	50	269	610	799	978
Tumorzellen lebend in Prozent	74	96,1	95,8	98,7	98,9
Tumorumfang in ml	0,2	1,5	2,1	7,4	12,8
Gesamtzellvolumen in ml		0,4	0,5	1,3	2,2
Durchmesser der Tumorzellen(in ") berechnet		13,5	16,0	17,5	18,0
Generationszeit in h	19,2	36,8	157,8	147,2	109,6
Serum-LDH in BUE	91	107	34	93	248
					9

Das Wachstum eines LDH-Virus enthaltenden KAT. in der 2. Spalte jeder Kubrik
sind die Werte der virusfreien Kontrolltumoren aufgeführt. Zweite Versuchsreihe.

D. D I S K U S S I O N

=====

Das wesentliche Ergebnis unserer Untersuchungen ist, daß in SaI Tumoren und Krebs-Ascites Tumoren nicht mehr LDH-Virus enthalten ist als in den Organen von tumorfreien Mäusen. Auch zwischen Tumorascites und den Organen der Tumormäuse besteht kein unterschiedlicher Virustiter. Dieses Ergebnis ist für den SaI Tumor statistisch gesichert. Das bedeutet, daß die Virusreplikation bei Tumormäusen nicht anders ist als bei Normalmäusen. Dabei ist es belanglos, ob der Tumor primär mit dem Virus infiziert war oder erst im Versuch mit dem Virus beimpft wurde. Die Befunde stimmen mit früheren aus unserem Labor (GEORGII u. Mitarb., 9) und mit anderen Autoren (NOTKINS u. Mitarb., 17) überein.

Auch das Wachstum von Tumoren ist nach RV-Infektion unverändert, wie wir an verschiedenen Parametern, wie Tumolvolumen, Zellgehalt der Tumoren, Nekroseindex der Tumorzellen, Größe der Tumorzellen und Generationszeitbestimmung, darlegen konnten.

Unsere Ergebnisse widersprechen eindeutig denen von BAILEY u. Mitarb. (2), die bei Verwendung eines Ehrlich-Ascitestumors eine Wachstumsbeschleunigung des virushaltigen Tumors gegenüber dem virusfreien festgestellt haben; sie haben als einzigen Parameter den Zellgehalt der Tumoren bestimmt, während wir weitere Größen gemessen haben. RILEY hatte früher für Tumoren, die durch Methylchlorantren induziert und transplantiert waren, eine Wachstumsbeschleunigung nach RV-Infektion angegeben (RILEY 23, 24).

BAILEY's Versuchsanordnung ist mit unserer gut vergleichbar, nur sind unsere Befunde wegen der besseren Auswertung durch mehrere Vergleichsgrößen aussagekräftiger.

Wir sind deshalb sicher, daß Wachstum von Impftumoren durch das RV nicht meßbar beeinflußt wird.

Deshalb müssen wir die eingangs gestellten Fragen, ob Riley-Virus in Mäusetumoren angereichert wird oder deren Wachstum beeinflußt, verneinen. Damit ist ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit gegeben, daß das RV eine Begleitinfektion der Mäusetumoren ist und infolge der laufenden Transplantationen so weit verbreitet wird. Allerdings bleibt damit ungeklärt, warum Tumormäuse nach dieser Virusinfektion einen wesentlich höheren Encymanstieg an LDH zeigen als tumorfreie Normalmäuse. RILEY (24) hat dies als Synergismus zwischen Virus- und Tumorstoffwechsel bezeichnet. Der Encymanstieg nach RV-Infektion beruht nach heute geltender Ansicht auf einer retardierten Encym-Clearance, weil offenbar das Virus in den encymabbauenden Zellen des RES enthalten ist und dort repliziert wird.

Wenn man eine Doppelfunktion dieser RES-Zellen, einmal für den Encymabbau und zum anderen für den Tumorzellabbau, annimmt, dann könnte diese Doppelbelastung des Zellsystems den besonders hohen Encymaufstau im Serum von Tumortieren gut verständlich machen.

Tumorkranke Patienten haben häufig erhöhte Serumenzyme, besonders an LDH; vielleicht handelt es sich dabei um ähnliche Störungen, wie sie hier im Versuchssystem durch Virusinfektion und RES-Blockade gegeben sind. Damit wären die Encymverschiebungen unabhängig vom Tumorstoffwechsel, was in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

Die Beziehungen des LDH-Virus zu den Mäuseimpftumoren SaI-Landschützsarkom und Krebs-Ascites Tumor wurden untersucht. Es ergab sich keine bevorzugte Vermehrung des LDH-Virus' in den Tumoren. Durch gezielte Infektion mit LDH-Virus wird das Wachstum des Krebs-Ascites Tumors nicht verändert. Daraus ergibt sich, daß Tumorzellen keine bevorzugten Wirtszellen für das LDH-Virus sind und das Tumorstadium durch das LDH-Virus nicht beeinflußt wird. Es wird vermutet, daß das Virus nur zufällig in den Mäusetumoren enthalten ist.

F. LITERATURVERZEICHNIS

=====

1. Adams D.H.,
K.E.K. Rowson, and
M.H. Salaman: The effect of tumours, of leukaemia,
and of some viruses associated with
them, on plasma lactic dehydrogenase
activity of mice.
Brit. J. Cancer 15, 860 (1961).
2. Bailey J.M.,
J. Clough, and
A. Lohaus: Influence of LDH-Viruses on growth
of Ehrlich Ascites Tumour in mice.
Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 119,
1200 (1965).
3. Bayerle H.,
A. Georgii und
K.E. Richard: Über die Aktivität von Serumfermenten
nach zellfreier Beimpfung mit Ehrlich-
schem Mäusetumorascites.
Klin. Wschr. 40, 920 (1962).
4. Georgii A.: Die Aktivitätsänderung der Lactat-
dehydrogenase im Serum nach Infektion
mit Geschwulstvirus der Maus als Re-
gulationsstörung in vivo.
Verh. dtsch. Ges. Path. 46, 357 (1962).
5. Georgii A.: Über das Lactatdehydrogenase-erhöhende
Virus in Laboratoriumsgeschwülsten.
Klin. Wschr. 42, 559 (1964).
5. Georgii A.,
H. Bayerle,
D. Brdiczka und
H. Zobl: Über ein die Lactatdehydrogenase im
Serum aktivierendes Virus aus Geschwül-
sten der Maus.
Z. Krebsforsch. 65, 334 (1963).
7. Georgii A. und
I. Kirschenhofer: Über die Isolierung von Lactatdehydro-
genase-erhöhendem Virus aus wilden Mäu-
sen.
Z. Naturforschg. 20 b, 1310 (1965).
8. Georgii A.,
H. Kroth und
H. Bayerle: Weitere Untersuchungen über die Akti-
vierung der Lactatdehydrogenase im
Serum durch ein Geschwulstvirus der
Maus.
Klin. Wschr. 40, 363 (1962).

9. Georgii A. und
L. Thorn: Die Wirkung von Lactatdehydrogenase-
erhöhendem Virus (Riley-Virus) bei
Mäusen mit primären und transplan-
tierten Carcinomen.
Z. Krebsforsch. 67, 156 (1965).
10. Hill B.R., and
C. Levi: Elevation of a serum component in
neoplastic diseases.
Cancer Res. 14, 513 (1954).
11. Kirschenhofer I.: Über ein Encym-erhöhendes Virus aus
Mäusegeschwülsten (Riley-Virus):
V. Vorkommen von Riley-Virus bei klei-
nen Laboratoriumstieren, sowie Isolie-
rung und Charakterisierung zweier Virus-
linien von wild-lebenden Mäusen.
Inaug.-Diss., München 1967.
12. Löblich und
Landschütz: Vergleichende elektronenoptische Unter-
suchungen am Ehrlich- und Sal-Ascites-
tumor.
Z. Krebsforsch. 63, 269 (1960).
13. Lucké B. and
M. Berwick: Quantitative relation between growth
of Ehrlich Ascites Tumour and reduc-
tion of liver catalase activity.
J. Nat. Cancer Inst. 15, 99 (1954).
14. Mundy J., and
P.C. Williams: Transmissible agent associated with
some mouse neoplasm.
Science 134, 834 (1961).
15. Notkins A.L.,
R.J. Berry,
J.B. Moloney and
R.E. Greenfield: Relationship of the lactic dehydro-
genase factor of certain murine tu-
mours.
Nature (London) 193, 79 (1962).
16. Notkins A.L. and
R.E. Greenfield: Infection of tumor-bearing mice with
the lactic dehydrogenase agent.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 109, 988
(1962).
17. Notkins A.L.,
R.E. Greenfield,
D. Marshall, and
L. Bane: Multiple enzyme changes in the plasma
of normal and tumor-bearing mice fol-
lowing infection with the lactic-dehy-
drogenase agent.
J. exp. Med. 117, 185 (1963).
18. Notkins A.L., and
S.J. Shochat: Studies on the multiplication and pro-
perties of the lactic dehydrogenase
agent.
J. exp. Med. 117, 735 (1963).

19. Pope J.H., and W.P. Rowe: Identification of WM 1 as LDH-virus and its recovery from wild mice. Proc. Soc. exp. Biol. 116, 1015 (1964).
20. Rauhen H.M. und H. Hupe: Das Lactatdehydrogenase-Agens im Blute tumortragender Mäuse. Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 13, 1933 (1963).
21. Reed L.J., and H. Muench: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer. J. Hyg. 27, 493 (1938).
22. Riley V.: Adaption of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 104, 751 (1960).
23. Riley V.: Syneristic glycolytic activity associated with transmissible agents and neoplastic growth. J. Gen. Physiol. 45, 614 (1962).
24. Riley V.: Virus-tumor synergism. Science 134, 666 (1961).
25. Riley V., E. Huerto, D. Bardell, J.D. Loveless, and M.A. Fitzmaurice: Influence of LDH-elevating viruses on normal and tumor-bearing hosts. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, 354 (1962).
26. Riley V., E. Huerto, F. Lilly, D. Bardell, J.D. Loveless, and M.A. Fitzmaurice: Some characteristics of virus-like entities associated with thirty varieties of experimental tumors. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 261 (1961).
27. Riley V., J.D. Loveless, and M.A. Fitzmaurice: Comparisons of a Lactate Dehydrogenase elevating viruslike agent and Eperythrozoon Coccoides. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 116, 486 (1964).
28. Riley V., F. Lilly, E. Huerto, and D. Bardell: Transmissible agent associated with 26 types of experimental mouse neoplasm. Science 132, 545 (1960).

29. Rowson K.E.K.,
D.H. Adams, and
M.H. Salaman: Riley's enzyme elevating virus: A study of the infection in mice and its relation to virus induced leukemia. VIII. Inter. Cancer Congr. Moscow 1962.
30. Rowson K.E.K.,
B.W.J. Mahy, and
M.H. Salaman: Studies on the mechanism of action of Riley virus.
II. Action of substances affecting the reticulo endothelial system on the level of viraemia.
J. exp. Med. 122 (1965).
31. Schrek R.: Method of counting the viable cells in normal and malignant cell suspension.
Amer. J. Cancer 28, 389 (1936).
32. Schwartz M.A.,
M. West,
W.S. Walsh, and
H. Zimmermann: Serum enzymes in disease: VIII. Glykolytic and oxydative enzymes and transaminase in patients with gastrointestinal carcinoma.
Cancer (Philad.) 15, 346 (1962).
33. Thorn L.: Das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus aus Mäusegeschwülsten (Riley-Virus): IV. Die Wirkung des Virus bei Mäusen mit primären und transplantierten Carcinomen.
Inaug.-Diss. München 1966.
34. Zobl H.: Das Lactatdehydrogenase-erhöhende Virus aus Mäusegeschwülsten (Riley-Virus): I. Sein Vorkommen in einigen Geschwülsten und einige Eigenschaften bei seiner Übertragung.
Inaug.-Diss. München 1965.

A D D E N D U M
=====

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Georgii
vom Pathologischen Institut der Universität München
für die Anregung und Leitung der Arbeit sowie bei
Fräulein Bachl, Frau Isaak und Fräulein Schmitt für
die technische Mithilfe.

LEBENS LAUF

=====

Ich wurde am 2. Oktober 1941 als Sohn des Wilhelm Ostertag und seiner Ehefrau Elisabeth in Heubach geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Heubach, von 1951 bis 1957 das Progymnasium in derselben Stadt und von 1957 bis zum Abitur 1960 das Parler-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd.

Medizin studierte ich von 1960 bis 1963 an der Universität in Erlangen, von 1963 bis 1964 an der Universität in Wien und von 1964 bis zum Medizinischen Staatsexamen an der Universität in München.

Von November 1966 bis März 1967 war ich auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Vilsbiburg, von April 1967 bis Dezember 1967 auf der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des St. Bonifatius Krankenhauses in Dortmund als Medizinalassistent tätig.

Seit Januar 1968 arbeite ich an der 2. Medizinischen Klinik der Universität in München als Medizinalassistent.

